

Substitution von Formalin und Xylol im Histolabor

Geht das?

Ferdinand Bucerius – 25.05.2019

- **Xylol-Ersatzstoffe** und alternative Reagenzien zur Gewebeentwässerung – Erfahrungsbericht
- Glyoxal als **Formalinersatz**? – Ein Blick in die Literatur
- Produkte für ein **sicheres Arbeiten** mit Formalin – Ein Überblick

- **Xylol-Ersatzstoffe** und alternative Reagenzien zur Gewebeentwässerung – Erfahrungsbericht
- Glyoxal als **Formalinersatz**? – Ein Blick in die Literatur
- Produkte für ein **sicheres Arbeiten** mit Formalin – Ein Überblick

Der Markt

Beispiele: „Xylol-Ersatzstoffe“ auf dem Markt als Clearing-Reagenzien/Intermedien

Neo-Clear® (Merck)

MileGreen
(Milestone)

X-free (Bio-Optica)

Microclearing
(Diapath)

Limonen
(SAV)

Roti®-Histol
(Cal Roth)

Bio Clear
(Bio-Optica)

Die meisten davon haben aber ebenfalls unerwünschte Eigenschaften

Toxisch



Teuer

Geruchsintensiv



Die Ausgangslage

Gemischte Hautproben, teilweise hoher Fettanteil, oftmals unbefriedigende Entwässerungsergebnisse



www.medite.de/uploads/media/TPC_15_Duo-Trio_dts_2010_01.pdf

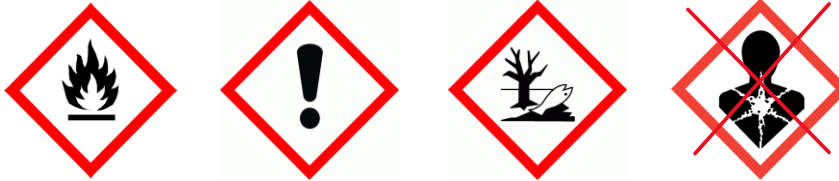


www.milestonemedsrl.com/product/logos-one/

Ziel: Verbesserung der Ergebnisse, Reduzierung des Einsatzes von Xylol

Die Reagenzien

Ottix Plus und Ottix Shaper (Diapath S.p.A.)



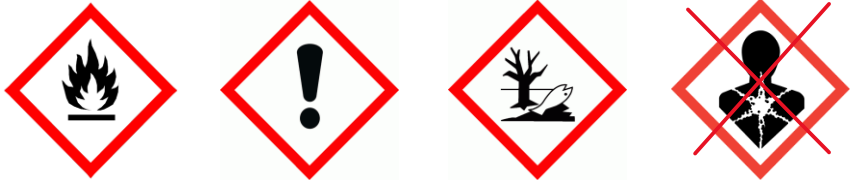
- Gewebeprozessierung: Einsatz als Ersatz für die aufsteigende Alkoholreihe sowie als Intermedium (Xylolersatz)
- Färbung: Verwendbar für die Entparaffinierung und Entwässerung/Clearing der gefärbten Schnitte (nicht geeignet zum direkten xylolbasierten Eindecken; Zwischenschritt erforderlich)



Mit Genehmigung von Diapath S.p.A

Die Reagenzien

Ottix Plus und Ottix Shaper (Diapath S.p.A.)



- **Gewebeprozessierung: Einsatz als Ersatz für die aufsteigende Alkoholreihe sowie als Intermedium (Xylolersatz)**
- Färbung: Verwendbar für die Entparaffinierung und Entwässerung/Clearing der gefärbten Schnitte (nicht geeignet zum direkten xylolbasierten Eindecken; Zwischenschritt erforderlich)

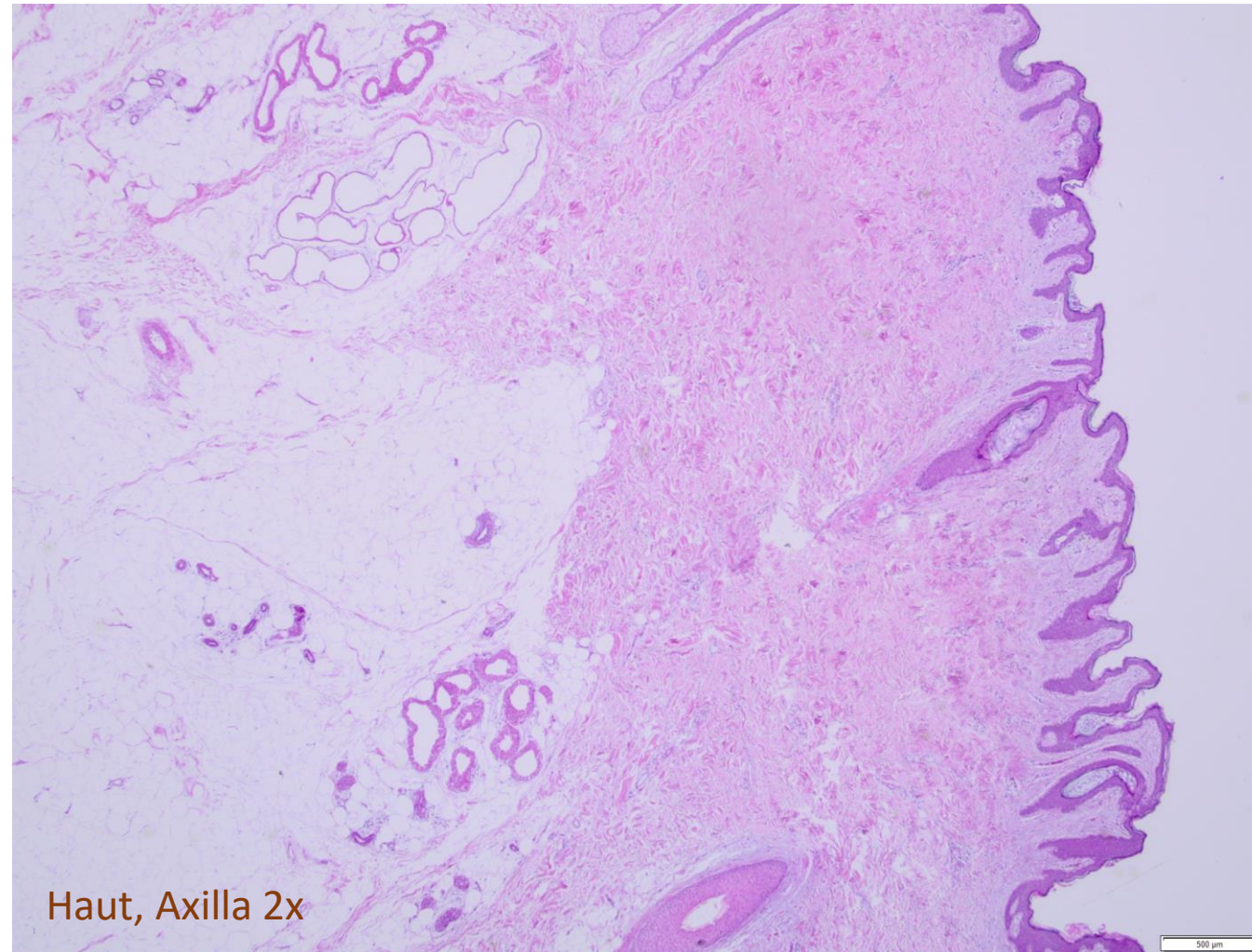


Mit Genehmigung von Diapath S.p.A

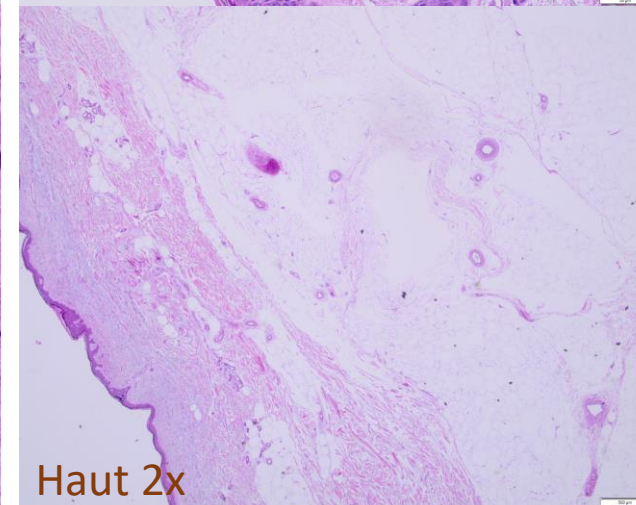
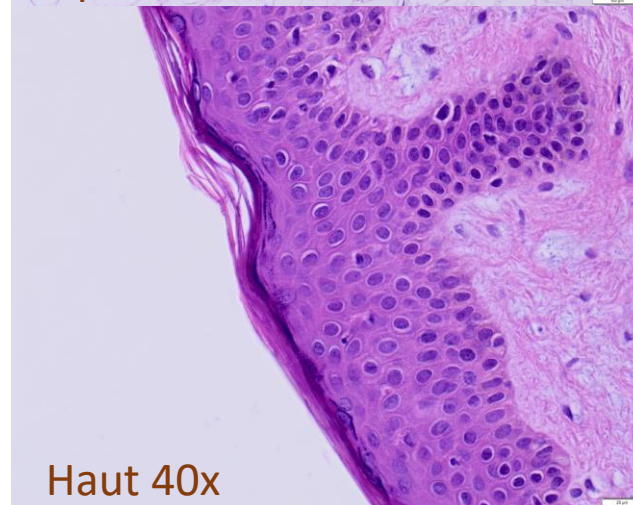
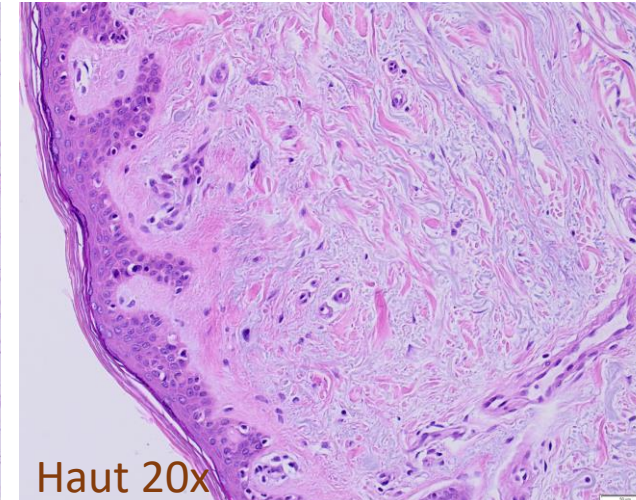
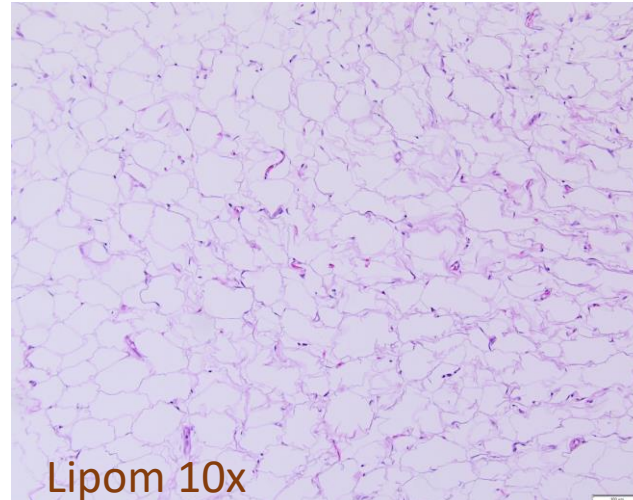
Planung – Durchführung – Überprüfen – Anpassen

- **Informationsbeschaffung:** Rücksprache mit unserem Händler für Verbrauchsmaterial, Kontaktaufnahme zum Hersteller
- **Projektplanung**
 - benötigte Mengen (1 Entwässerungsautomat, 2 Wochen Test)
 - Zeitpunkt (reduzierter Probeneingang in der Woche nach den Ferien)
 - Art der Proben (Restmaterial, Asservate)
- **Erstbeschaffung** der Reagenzien in ausreichenden Mengen
- Anpassung der **Protokolle** (zusammen mit Hersteller und Lieferant)
- **Durchführung** erster Tests und Beurteilung durch die Pathologen
- Implementation in der **Routine** nach wenigen Tagen
- Beobachtung der Ergebnisse über mehrere Wochen und **Anpassung** der Wechselzyklen

Die Ergebnisse



Die Ergebnisse



Außerdem:

- ✓ Sonderfärbungen
- ✓ IHC
- ✓ MolPath

Die Ergebnisse

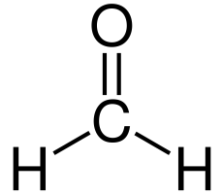
- **Reibungsloses** Einfügen in den Workflow
- **Weniger Geruchsbelastung** durch toxisches Xylol
- Weniger verschiedene Reagenzien → **vereinfachte Beschaffung**

2 Reagenzien	5 Reagenzien
Ottix Shaper	70% Ethanol
Ottix Plus	80% Ethanol
	96% Ethanol
	Isopropanol
	Xylol

- Weniger **Reagenzienverbrauch** insgesamt durch angepasstes Reagenzienmanagement
- **Bessere Ergebnisse** beim Schneiden (Labor) sowie morphologisch (Pathologe)

- **Xylol-Ersatzstoffe** und alternative Reagenzien zur Gewebeentwässerung – Erfahrungsbericht
- Glyoxal als **Formalinersatz?** – Ein Blick in die Literatur
- Produkte für ein **sicheres Arbeiten** mit Formalin – Ein Überblick

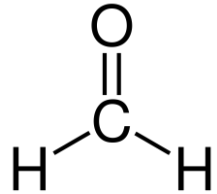
Formaldehyd 4% (Formalin 10%)



Keimzellmutagen Kat. 2
Karzinogen Kat. 1B

H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen
H350: Kann Krebs erzeugen

Formaldehyd 4% (Formalin 10%)



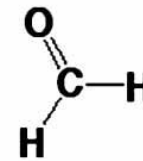
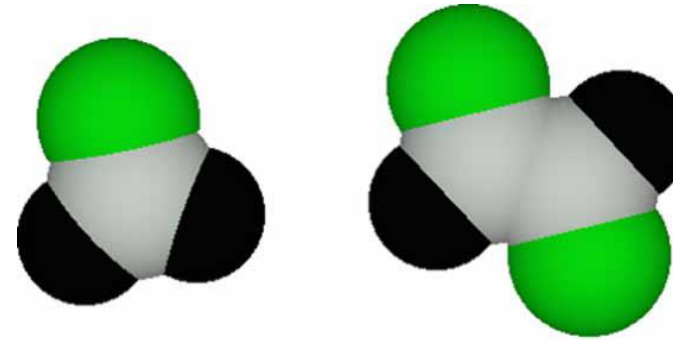
Keimzellmutagen Kat. 2
Karzinogen Kat. 1B

H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen
H350: Kann Krebs erzeugen

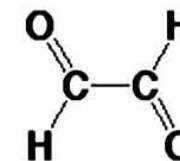
Es gibt viele Fixierungsmethoden, aber welche kommt der Formalinfixierung am nächsten?

Glyoxal (Ethandial, Oxalaldehyd)

- **Kein Ausdampfen** aus der Lösung
- **Schnelleres Eindringen** ins Gewebe
- Sehr gut erhaltene **Morphologie**
- Anpassungen bei Epitope retrieval erforderlich (Imidazolreaktion!)
- Erythrozyten werden lysiert
- Einsatz als sekundäres Fixative (Haltelösung im Prozessor) ist denkbar



Formaldehyde



Glyoxal

Dapson, RW (2007) 'Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval', Biotechnic and Histochemistry, 82:3, 161 - 166

Glyoxal (Ethandial, Oxalaldehyd)

H&E

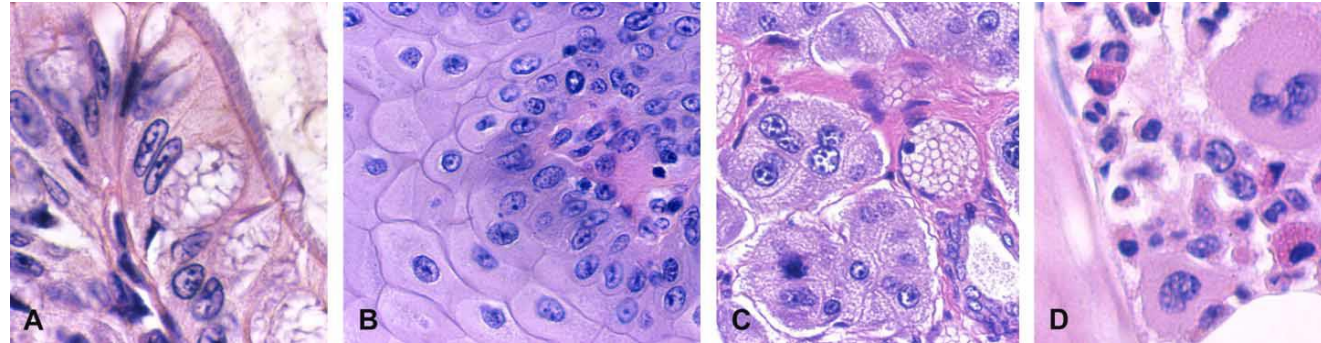


Fig. 2. Glyoxal fixed tissue is characterized by clarity of cellular detail. (A) Brush borders and active secretion of mucus by a goblet cell are obvious in this colon. H & E, 100. (B) Stratified squamous epithelium from the soft palate appears almost three-dimensional. H & E, 50. (C) Erythrocytes are lysed after glyoxal fixation, as seen in the small vein in this salivary gland. H & E, 50. (D) Eosinophilic leucocytes fail to stain vivid red, but usually are still evident, as in this decalcified bone marrow biopsy. H & E, 100.

Sonderfärbungen

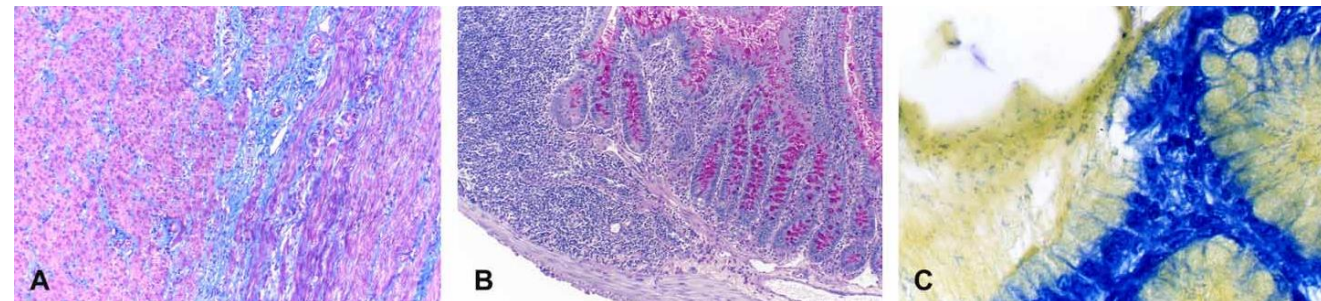


Fig. 3. Nearly all special stains perform well with glyoxal fixed tissue, with one notable exception. (A) Trichrome stain on uterus, 10. (B) PAS reaction yields specific results despite fixation by a dialdehyde, 10. (C) Silver reactions for *Helicobacter pylori* fail to stain. The microbes can be demonstrated clearly using a high contrast stain like Hp YellowHp blue, shown here; gastric biopsy, 80.

Dapson, RW (2007) 'Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval', *Biotechnic and Histochemistry*, 82:3, 161 - 166

Glyoxal (Ethandial, Oxalaldehyd)

IHC: teilweise
Anpassungen notwendig

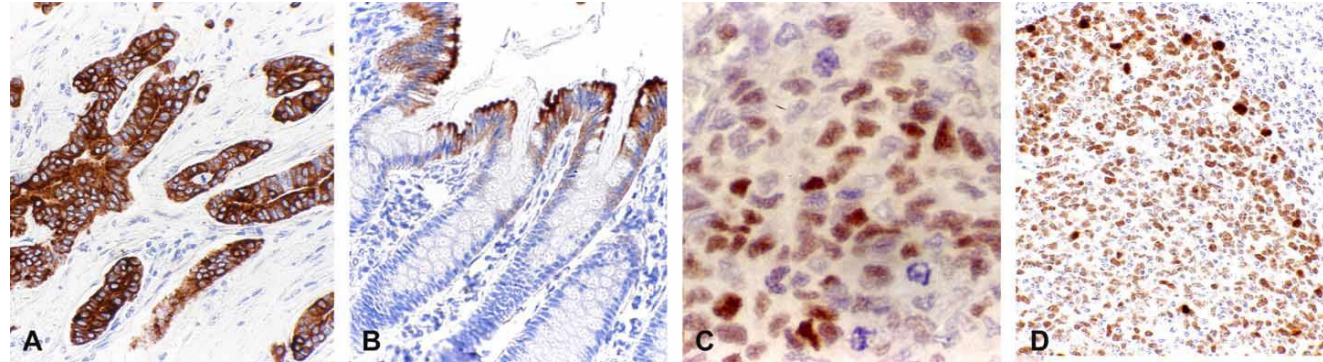


Fig. 5. Most antibodies should be used without antigen retrieval; when it is needed, a special high temperature, high pH regimen is recommended. (A) CK7 without antigen retrieval, ductal adenocarcinoma, 20. (B) CK20 without antigen retrieval, demonstrating brush borders in normal colon, 20. (C) Progesterone receptor assay without antigen retrieval, breast tumor, 50. (D) Ki-67 (clone DVB-2) with glyoxal-specific HIER. Tonsil, 20.

Dapson, RW (2007) 'Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval', Biotechnic and Histochemistry, 82:3, 161 - 166

Gute Ergebnisse auch bei DNA-Isolierung und FISH

Glyoxal – Warum verwendet es keiner?

Es sind die Empfehlungen der interdisziplinären S3-Leitlinien sowie die Vorgaben der DAkKS zu beachten bzw. zu befolgen.

Primärantikörper zur Verwendung in der IHC sind von Herstellerseite aus meist nur auf FFPE-Material validiert.



Was können wir dann tun?

Schutzmaßnahmen ergreifen:

- **T**echnisch



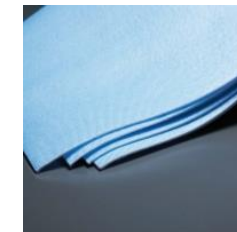
www.diapath.com/product/ventilated-dissecting-workbech-zefiro-90-bt09xx-271

- **O**rganisatorisch



Bild: DPA | Karl F. Schöffmann / Imagebroker

- **P**ersönlich (PSA, Formalin-Pads, etc.)



www.bio-optica.it/en/products/81/129/2

- **Xylol-Ersatzstoffe** und alternative Reagenzien zur Gewebeentwässerung – Erfahrungsbericht
- Glyoxal als **Formalinersatz?** – Ein Blick in die Literatur
- Produkte für ein **sicheres Arbeiten** mit Formalin – Ein Überblick

Was können wir dann tun?

Lösungen auf dem Markt, um den Kontakt zu Formalin zu minimieren:

„**Barrier Solution**“: Verhindert ein Ausdünsten von Formalindämpfen

Weitere Produkte:

Milestone:

DDK:

etc.

FormSAFE
SafeSystem

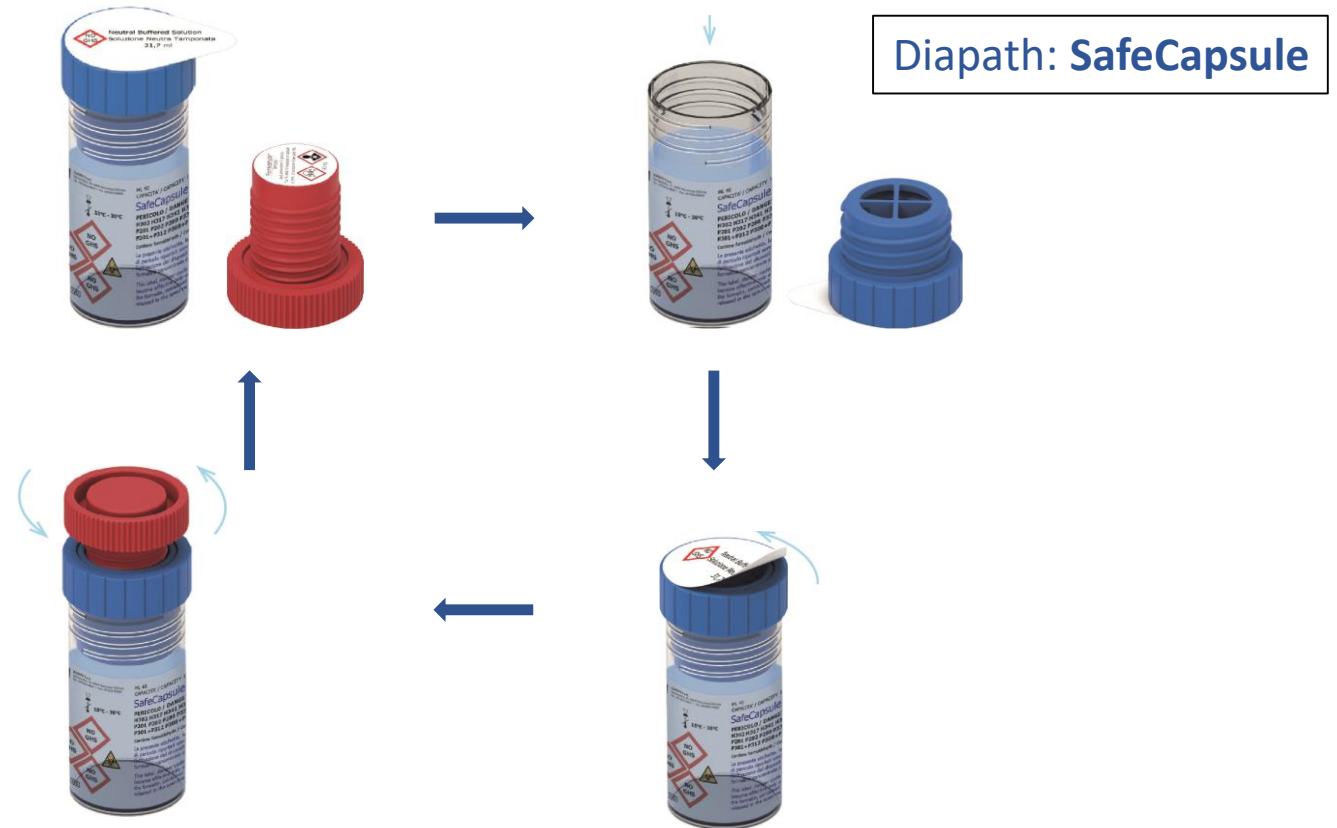


Mit Genehmigung von Diapath S.p.A

Was können wir dann tun?

Geschlossenes System innerhalb des
Versandgefäßes verhindert den Kontakt zu
Formalin

Weitere Produkte:
BiopSafe®
Bio-Optica: **Klessidra 2.0**



Mit Genehmigung von Diapath S.p.A

Fazit

- Gute und sinnvolle Produkte zur Substitution von Xylol verfügbar, die gleichzeitig den Entwässerungsprozess verbessern können

Fazit

- Gute und sinnvolle Produkte zur Substitution von Xylol verfügbar, die gleichzeitig den Entwässerungsprozess verbessern können
- Alternativen zur Formaldehyd-Fixierung sind theoretisch ebenfalls vorhanden, aufgrund von Richtlinien und Leitfäden jedoch schwierig einzusetzen. Glyoxal (z.B. GreenFix) als sekundäres Fixativ (Haltelösung im Prozessor) ist denkbar

Fazit

- Gute und sinnvolle Produkte zur Substitution von Xylol verfügbar, die gleichzeitig den Entwässerungsprozess verbessern können
- Alternativen zur Formaldehyd-Fixierung sind theoretisch ebenfalls vorhanden, aufgrund von Richtlinien und Leitfäden jedoch schwierig einzusetzen. Glyoxal (z.B. GreenFix) als sekundäres Fixativ (Haltelösung im Prozessor) ist denkbar
- Es gibt Produkte, die das Arbeiten mit Formaldehyd sicherer machen

Sprechen Sie mit dem Händler Ihres Vertrauens!

Bleiben Sie auf dem Laufenden!

Tauschen Sie Erfahrungen mit anderen Laboren aus!

Versuchen Sie etwas Neues!

Kontakt

Manfred Fremdling

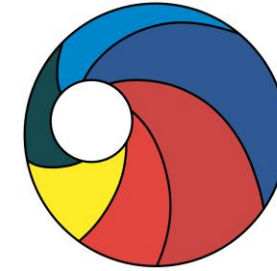
T +49 (0) 8708 92160
F +49 (0) 8708 92165
E fremdling@laborbedarf-fb.de

Ferdinand Bucerius

T +49 (0) 8708 92160
M +49 (0) 171 5282401
F +49 (0) 8708 92165
E bucerius@laborbedarf-fb.de

Laborbedarf Fremdling & Bucerius

Geberskirchen 3, 84069 Furth/Landshut
T +49 (0) 8708 92160
F +49 (0) 8708 92165
E info@laborbedarf-fb.de
www.laborbedarf-fb.de



Laborbedarf
Fremdling &
Bucerius

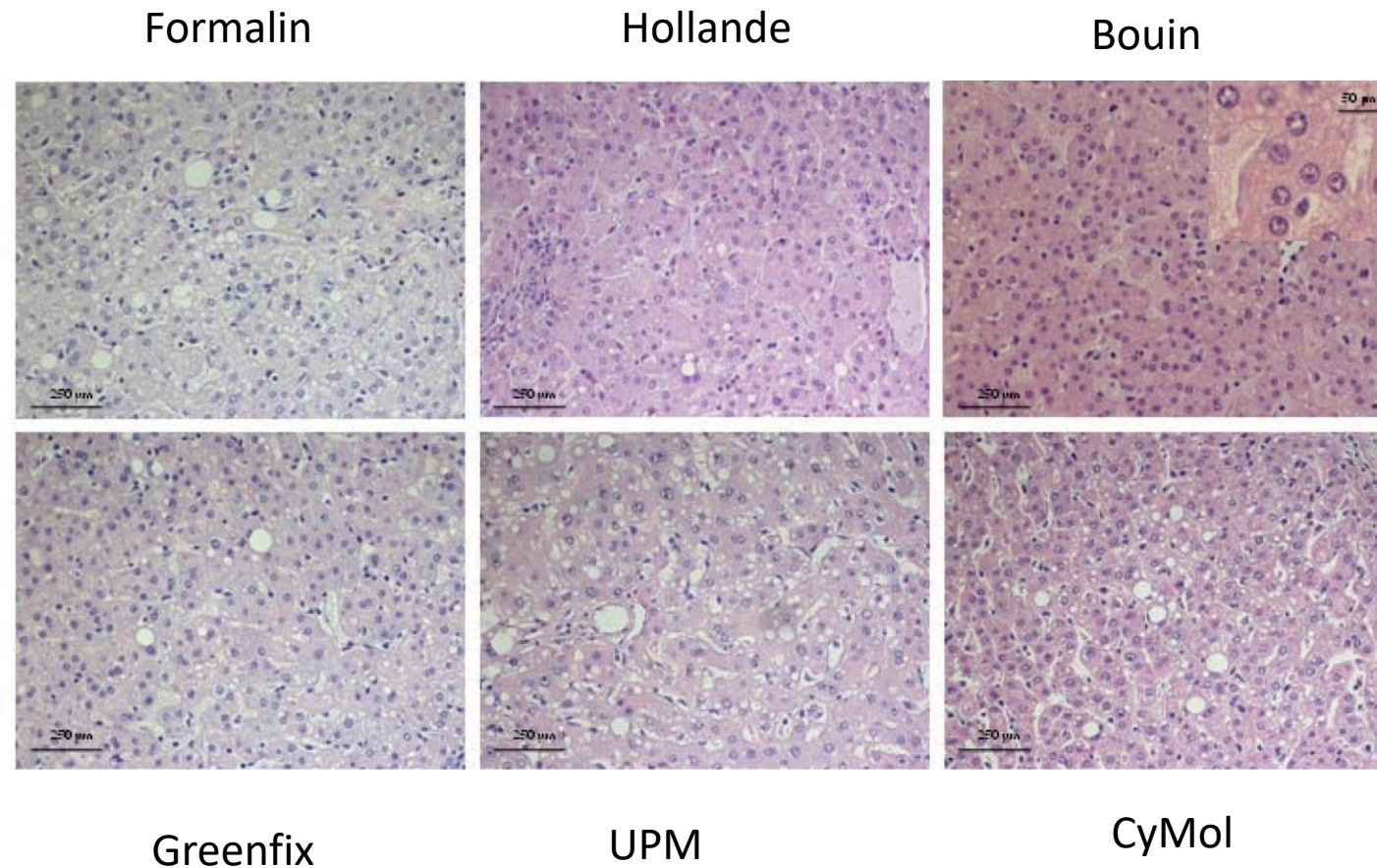
Sprechen Sie uns an!



Service & Vertrieb von Histologiegeräten

Anhang: Vergleich unterschiedlicher Fixiermethoden

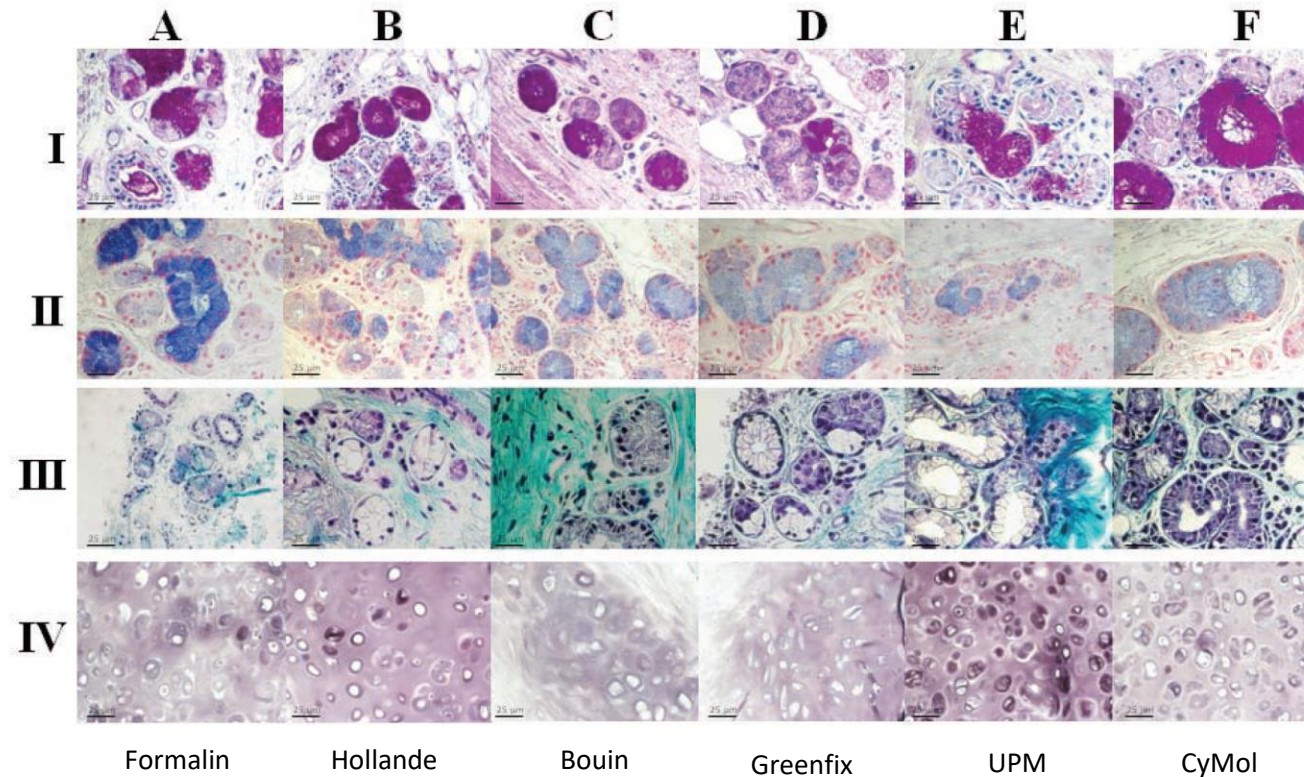
Figure 1. Hematoxylin-eosin staining (H&E). Representative sections of H&E stained liver biopsy following fixation with: A) formalin; B), Hollande; C), Bouin; D), Greenfix; E), UPM; F), CyMol.



L. Benerini Gatta et al., 2012, European Journal of Histochemistry 2012; 56:e12, doi:10.4081/ejh.2012.e12

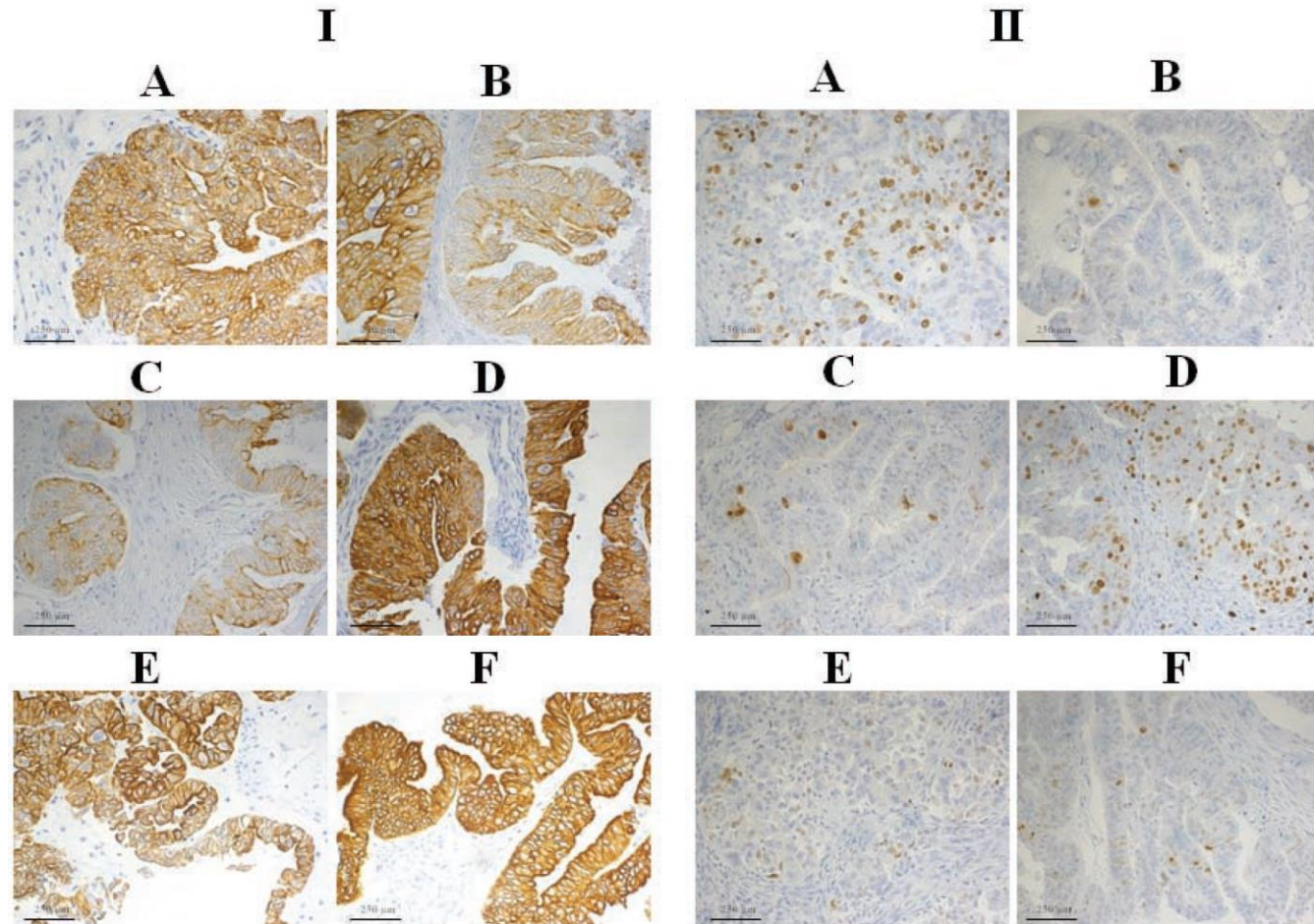
Anhang: Vergleich unterschiedlicher Fixiermethoden

Figure 2. Histochemistry.
Bronchial tissue stained with:
I), PAS; II) Alcian-blue; III)
Trichrome; IV) High Iron
Diamine (IV), following
fixation with: A) formalin; B)
Hollande; C) Bouin; D),
Greenfix; E), UPM; F), CyMol.



Anhang: Vergleich unterschiedlicher Fixiermethoden

Figure 3. Immunohistochemistry.
Immunohistochemical staining with
of mixed
endometrioid serous papillary
carcinoma of ovary using: I), CK-PAN
and II), Ki-67 antibodies
following fixation with: A) formalin;
B) Hollande; C) Bouin; D), Greenfix;
E),
UPM; F), CyMol.



L. Benerini Gatta et al., 2012, European Journal of Histochemistry 2012; 56:e12, doi:10.4081/ejh.2012.e12

Anhang: Vergleich unterschiedlicher Fixiermethoden

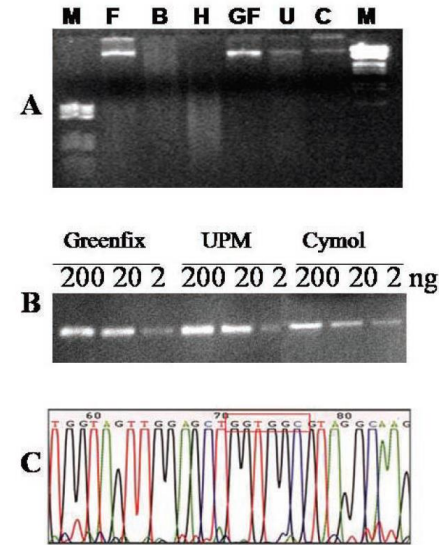


Figure 4. Molecular biology. A), electrophoresis of DNA extracted from liver tissue fixed with formalin (F), Bouin (B), Hollande (H), Greenfix (GF), UPM (U) and CyMol (C). The bands are similar in F, GF, U and C. B), PCR obtained with 200, 20 and 2 ng of DNA extracted from tissues fixed in Greenfix, UPM, CyMol. The amplification was achieved even at low concentrations of DNA with the three alternative fixatives. C), sequence analysis of the DNA amplified and purified from samples fixed with CyMol demonstrated a K-RAS wild type.

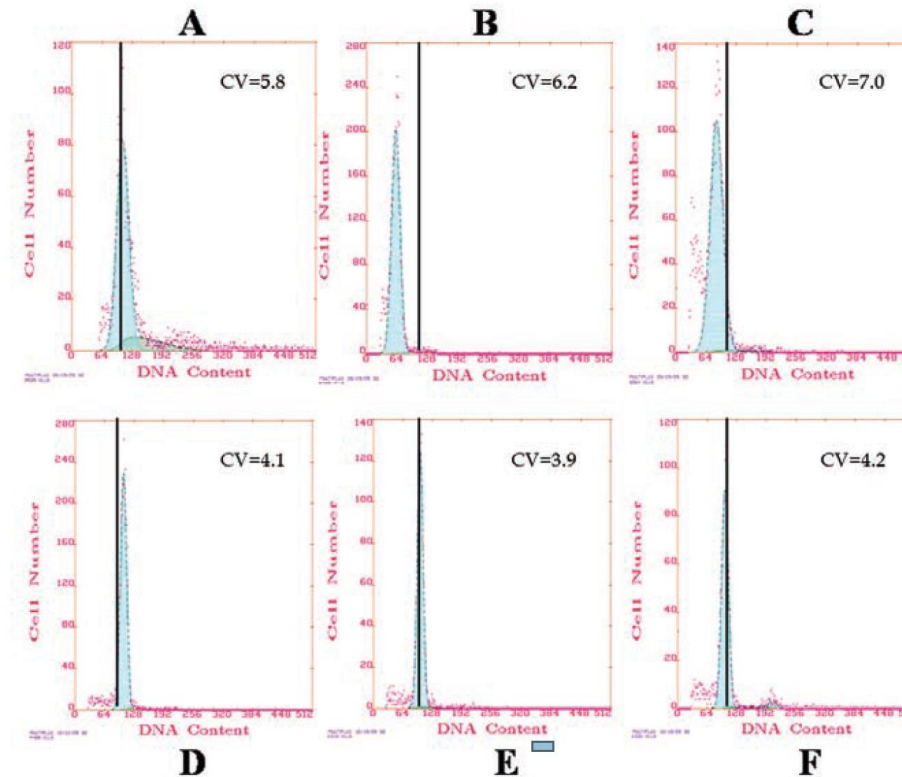


Figure 6. Flow cytometry analysis of DNA. Flow cytometry analysis of DNA content of lung tissue showed that the fixatives Greenfix, UPM, CyMol (D-E-F) gave results similar to formalin fixation (A). Shift left of the control is more evident in the two samples fixed with Bouin (C) and Hollande (B).

Anhang: Vergleich unterschiedlicher Fixiermethoden

Figure 5. FISH analysis. The signal intensity of the centromeric probe is similar in: A), formalin and B), Greenfix; C), UPM and D) CyMol fixed liver tissue. Figure

